

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program : Biochemie
Studijní obor : Biochemie



Sandra Šandová

Studium kyselé fosfatasy hrachu setého a tabáku
Study of acid phosphatase in pea and tobacco

Bakalářská práce

Vedoucí závěrečné práce : doc. RNDr. Helena Ryšlavá CSc.

Praha, 2012

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 28.5.2012

Podpis

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala své vedoucí bakalářské práce doc. RNDr. Heleně Ryšlavé CSc. za konzultace a odborné vedení při zpracovávání této práce. Dále bych chtěla poděkovat RNDr. Veronice Doubnerové Ph.D. a Mgr. Kateřině Růžičkové za cenné rady a vytvoření příjemné pracovní atmosféry. A v neposlední řadě, také své rodině a přátelům za psychickou a morální podporu.

OBSAH

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	6
ABSTRAKT	7
ABSTRACT.....	8
1. ÚVOD.....	9
1.1. ENZYMY	9
1.1.1. VLIV pH A TEPLoty NA ENZYMovÉ REAKCE.....	9
1.2. FOSFOR A JEHO VÝZNAM PRO ROSTLINY	9
1.3. FOSFATASY	10
1.3.1. ALKALICKÉ FOSFATASY.....	11
1.3.2. KYSELÉ FOSFATASY.....	11
1.3.2.1. Specializované fosfatasy.....	12
1.3.2.2. Extracelulární a intracelulární kyselé fosfatasy	13
1.3.3. PROTEINFOSFATASY	13
1.3.3.1. Aktivita fosfatasy a jejich výzkum.....	14
2. CÍL PRÁCE.....	16
3. MATERIÁL A METODY	17
3.1. MATERIÁL A PŘÍSTROJE.....	17
3.1.1. ROSTLINNÝ MATERIÁL	17
3.1.2. CHEMIKÁLIE.....	17
3.1.3. PŘÍSTROJE.....	18
3.2. METODY A POSTUP	18
3.2.1. PŘÍPRAVA ENZYMU.....	18
3.2.1.1. Homogenizace a extrakce	18
3.2.2. STANOVENÍ FOSFATASOVÉ AKTIVITY	19
3.2.2.1. Stanovení množství <i>p</i> NP - fosfátu hydrolyzovaného fosfatase na čas	19
3.2.2.2. Stanovení množství vzniklého produktu v závislosti na množství enzymu	20
3.2.2.3. Stanovení rychlosti reakce katalyzované fosfatase na koncentraci substrátu	20

3.2.2.4.	Stanovení aktivity fosfatasy v závislosti na pH.....	21
3.2.2.5.	Stanovení fosfatasové aktivity v závislosti na teplotě.....	21
3.2.3.	STANOVENÍ FOSFATASOVÉ AKTIVITY VŮČI DALŠÍMU SUBSTRÁTU.....	22
3.2.3.1.	Stanovení volného fosfátu.....	22
3.2.3.1.a.	Množství uvolněného fosfátu katalyzovaného fosfatasou v závislosti na čase.....	23
3.2.3.1.b.	Štěpení fosfo – L serinu fosfatasy v závislosti na pH	23
3.2.3.1.c.	Rychlost reakce katalyzované fosfatasou na koncentraci substrátu	23
4.	VÝSLEDKY	24
4.1.	PŘÍPRAVA ENZYMOVÉHO EXTRAKTU	24
4.1.1.	ŠTĚPENÍ <i>pNP</i> -FOSFÁTU FOSFATASOU ZA URČITOU DOBU	24
4.1.2.	STANOVENÍ AKTIVITY FOSFATASY V ZÁVISLOSTI NA TEPLOTĚ.....	25
4.1.3.	STANOVENÍ AKTIVITY FOSFATASY V ZÁVISLOSTI NA <i>pH</i>	27
4.1.4.	ZÁVISLOST RYCHLOSTI REAKCE KATALYZOVANÉ FOSFATASOU NA KONCENTRACI SUBSTRÁTU <i>p-NPP</i>	28
4.1.5.	STANOVENÍ MNOŽSTVÍ VZNIKLÉHO PRODUKTU V ZÁVISLOSTI NA MNOŽSTVÍ ENZYMU 30	
4.2.	STANOVENÍ VOLNÉHO FOSFÁTU	32
4.2.1.	ZÁVISLOST MNOŽSTVÍ UVOLNĚNÉHO FOSFÁTU KATALYZOVANÉHO FOSFATASOU NA ČASE	32
4.2.2.	STANOVENÍ AKTIVITY FOSFATASY V ZÁVISLOSTI NA <i>pH</i>	33
4.2.3.	ZÁVISLOST RYCHLOSTI REAKCE KATALYZOVANÉ FOSFATASOU NA KONCENTRACI SUBSTRÁTU FOSFO – L - SERINU.....	35
5.	DISKUZE	37
6.	ZÁVĚR.....	40
7.	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	41

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

*p*NPP – *para* nitrofenyl fosfát

P_i – fosfátový anion

PP1 – proteinfosfatasa 1

PP2A – proteinfosfatasa 2A

V_{max} – maximální reakční rychlost

K_m – Michaelisova konstanta

[S] – koncentrace substrátu

PVP - polyvinylpyrrolidon

PTP – protein tyrosin fosfatasy

ABSTRAKT

Fosfatasy katalyzují hydrolytické štěpení esteru kyseliny orthofosforečné. Obecně jsou rozděleny na kyselé a alkalické fosfatasy dle jejich pH optima.

Byl připraven extrakt z listů *Nicotiana tabacum L.* a *Pisum sativum*. Dále se zjistily rychlostní konstanty fosfatas hrachu a tabáku. Rychlost reakce katalyzované fosfatasou tabáku je 10,0 $\mu\text{mol/min.ml}$ a hrachu 38,0 $\mu\text{mol/min.ml}$ s použitím substrátu *pNP* – fosfátu. Se substrátem fosfo – L serinem je rychlost reakce katalyzovaná fosfatasou tabáku 1,8 $\mu\text{mol/min.ml}$ a hrachu 0,4 $\mu\text{mol/min.ml}$.

Michaelisova konstanta K_m je pro fosfatasu tabáku 1,8 mM a pro fosfatasu hrachu 8,5 mM s použitím *pNP* – fosfátu jako substrát. Se substrátem fosfo – L serinem je K_m fosfatasy tabáku a hrachu stejná - 4,0 mM.

pH optimum fosfatasy hrachu je 5,0 při použití *pNP* – fosfátu jako substrát a pH 6,0 se substrátem fosfo – L serinem. Hodnota pH optima fosfatasy tabáku je 5,4 s použitím *pNP* – fosfátu a pH 7,0 s fosfo – L serinem.

Teplotní optimum fosfatasy hrachu je 60 °C a fosfatasy tabáku 55 °C.

Klíčová slova : fosfát, kyselá fosfatasa, *pNP* – fosfát, fosfo – L serin, tabák, hrách

ABSTRACT

Phosphatases catalyze the hydrolytic fission of orthophosphoric acid ester. They are generally divided into acid and alkaline phosphatases according to their pH optimum.

There was prepared the extract of leaves *Nicotiana tabacum L.* and *Pisum sativum*.

Furthermore, there were determined pea and tobacco phosphatases's rate constants. Reaction speed catalyzed by tobacco phosphatase is 10,0 $\mu\text{mol/min.ml}$ and by pea phosphatase 38,0 $\mu\text{mol/min.ml}$ using *para*NP – phosphate as a substrate. Using a substrate phospho – L serine the reaction speed catalyzed by phosphatase of tobacco is 1,8 $\mu\text{mol/min.ml}$ and by phosphatase of pea is 0,4 $\mu\text{mol/min.ml}$.

Michaelis constant K_m is 1,8 mM for tobacco phosphatase and 8,5 mM for pea phosphatase using *para*NP – phosphate. Using a substrate phospho – L serine Michaelis constant K_m of phosphatase of tobacco and pea is the same - 4,0 mM.

The pH optimum of pea phosphatase is 5,0 using *para*NP – phosphate as a substrate and 6,0 using phospho – L serine. pH optimum of tobacco phosphatase is 5,4 using *para*NP – phosphate and 7,0 using phospho – L serine.

Temperature optimum for pea phosphatase is 60 °C and for tobacco phosphatase 55°C.

Keywords : phosphate, acid phosphatase, pNP – phosphate, phospho – L serine, tobacco, pea

1. ÚVOD

1.1. ENZYMY

Enzymy jsou přírodní, živočišné a rostlinné katalyzátory urychlující a umožňující průběh biochemických reakcí. ^[1]

1.1.1. VLIV pH A TEPLoty NA ENZYMOVÉ REAKCE

Aktivita většiny enzymů závisí na koncentraci H^+ v prostředí. Pro většinu enzymů má tato závislost tvar křivky s maximem, hodnota pH odpovídající nejvyšší aktivitě se nazývá pH optimum. ^[2]

Rychlost většiny chemických reakcí a také reakcí enzymových závisí na teplotě. Jejich rychlost se přibližně dvakrát zvýší, když teplota stoupne o 10 °C. Většina enzymů je inaktivována kolem 55 – 60 °C, i když existují enzymy, které jsou aktivní i při 85 °C. ^[2]

1.2. FOSFOR A JEHO VÝZNAM PRO ROSTLINY

Fosfor je důležitou strukturní složkou mnoha makromolekul a účastní se důležitých biologických procesů jako je fotosyntéza, úspora energie, regulace enzymatické aktivity a řízení mnoha cest buněčné signalizace. ^[3]

V rostlinách se nachází anorganický fosfát (P_i) i jeho organická forma (organofosfáty). Dostupnost fosfátu je jednou z klíčových podmínek pro růst rostliny a P_i je pravděpodobně nejdůležitějším hnojivem polních plodin. ^[4]

Pro růst a vývoj rostlin je asimilace, ukládání a metabolismus P_i nezbytné. Rostliny se často setkávají s nedostatkem P_i v půdě. Ve snaze se s tímto nutričním stresem vyrovnat, vykazují odpovědi, které zvyšují získávání P_i a udržují tak buněčnou homeostázu. Těmito odpověďmi jsou fosfatasy, které se podílejí na získávání a zužitkování fosfátu. Tyto enzymy hydrolyzují P_i z monoesterů kyseliny fosforečné. ^{[5][3]}

Na rozdíl od asimilace dusičnanů a síranů, není fosfát při asimilaci redukován, zůstává ve svém oxidačním stavu a se širokou škálou organických látek tvoří fosfátové estery. Díky malé rozpustnosti fosfátu a jeho vysoké absorpční kapacitě v půdě, je pro rostlinné kořeny relativně nedostupný. Koncentrace fosfátu v půdě je většinou 1uM nebo menší a rychle se kořeny spotřebovává. Proto si rostliny vyvinuly několik strategií, jak P_i z půdy dostávat. Především tak, že kořeny dokážou modifikovat svoji strukturu a funkci, a to jak na buněčné, orgánové, tak systémové úrovni. ^[4]

Fosfát je do kořenů transportován aktivním, vysokomolekulárním mechanismem. Sledováním absorpce fosfátu pomocí radioaktivně značeného ^{32}P a sledováním spotřeby P_i bylo zjištěno, že $H_2PO_4^-$ je primární formou P transformovaného do kořenových buněk. Vzhledem k tomu, že kořenové buňky musí tento anion transportovat proti negativnímu Em uvnitř buňky a že koncentrace P_i v půdním roztoku obklopující kořeny je 1uM nebo menší zatímco koncentrace cytoplasmatického P_i se pohybuje v řádech milimolů, je transport P_i do kořenových buněk aktivní transport. ^[4]

Účinným způsobem, jak získávat organický fosfát je pro rostliny symbióza s houbami, kde je přeměna P_i na organickou formu P přenesena na půdní houby (mykorhiza). ^[4]

1.3. FOSFATASY

Fosfatasy jsou hydrolytické enzymy, které štěpí estery kyseliny fosforečné. Patří do skupiny hydrolas. Jsou hojně zastoupeny v prokaryotických i eukaryotických buňkách, kde jsou součástí různých regulačních a syntetických procesů. Důkaz fosfatasové aktivity a první pokusy s tímto enzymem byly provedeny v letech 1907 – 1913. Od té doby jsou fosfatasy intenzivně zkoumány.

Tyto enzymy mají velký význam, protože hydrolyzují sloučeniny organického fosfátu a přetvářejí je na anorganické formy, které mohou být rostlinami asimilovány. Činnost fosfatas indikuje množství a kvalitu fosforylovaného substrátu v půdě a je dobrým ukazatelem jejího biologického stavu.

Fosfatasy sehrály důležitou roli například v objasnění mechanismů syntézy proteinů a jsou využívány v klinické i mikrobiologické praxi jako tzv. diagnostické enzymy. ^{[6] [7] [8]}

Obecně jsou fosfatasy rozděleny podle jejich reakčního pH na alkalické (E.C. 3.1.3.1) s pH optimem 7,0 – 8,0 a kyselé (E.C. 3.1.3.2) s pH optimem 5,0, kdy je jejich funkce optimální. [6]
[9]

1.3.1. ALKALICKÉ FOSFATASY

Alkalické fosfatasy jsou molekuly hydrolyzující monoestery při pH optimu 8. V cytoplazmatické membráně savčích buněk jsou isoenzymy vázané pomocí glykosyl-fosfatidylinositolové vazby. V bakteriích je enzym volný, neboť nemá kovalentní modifikace jako je glykosylace nebo napojení na mastnou kyselinu. [9] [10]

Rostlinné alkalické fosfatasy většinou vykazují úplnou substrátovou specifitu. Příkladem může být cytosolická fruktosa-1,6-bisfosfatasa a sacharosa-6-fosfátfosfatasa. [11]

Alkalická fosfatasa funguje jako dimerní enzym skládající se ze dvou monomerů. I když je každý z monomerů utvářen stejně, svou aktivitu mohou vykazovat pouze pokud jsou spojené. V aktivním místě jsou uchovány části nezbytné pro katalytickou aktivitu enzymu, jsou to čtyři oblasti vázající kovové ionty. Dva z nich váží zinečnatý iont. Třetí oblast váže iont hořečnatý. Poslední, čtvrtá oblast váže vápenatý iont. [10]

Alkalická fosfatasa hraje svou nezastupitelnou roli v embryonálním vývoji. Bylo zjištěno, že tkáňově nespecifická alkalická fosfatasa hraje úlohu při mineralizaci kostí a mutace genu pro tento isoenzym vede k různým formám dědičné choroby spojené s nedostatečnou mineralizací kostní tkáně. [10]

1.3.2. KYSELÉ FOSFATASY

Kyselé fosfatasy lze rozdělit do dvou skupin na základě jejich substrátových preferencí. Vylučování kyselé fosfatasy u vyšších rostlin je univerzální odpovědí na nedostatek P_i . Vyskytují se převážně v jádře, buněčné stěně a v mezibuněčném prostoru. V menší míře se

také nacházejí v amyloplastech, mitochondriích, Golgiho aparátu a endoplazmatickém retikulu.
[3] [11] [12]

Fosfatasy skutečně nespecifické jsou enzymy jejichž specifita se odvíjí od substrátu, na který působí. Vyskytují se v širokém spektru rostlin a pletiv a významně se mezi sebou liší na základě fyzikálních vlastností. Všechny však mají důležitou roli v produkci, transportu a recyklaci P_i .^[11]

Druhou skupinou kyselých fosfatů jsou specializované enzymy, které mají významnou substrátovou specifitu.^[11]

1.3.2.1. Specializované fosfatasy

Existují specializované intracelulární fosfatasy, které mají významnou, i když ne úplnou substrátovou specifitu. Mezi takovéto specializované fosfatasy řadíme phytasy (EC 3.1.3.8), fosfoglykolátfosfatasy (EC 3.1.3.18), 3-fosfoglycerátfosfatasy (EC 3.1.3.38) a fosfoenolpyruvátfosfatasy (EC 3.1.3.60).^[11]

Phytasy katalyzují hydrolýzu kyseliny phytové na inositol polyfosfát a kyselinu fosforečnou.
[13]

Nedávná studie ukázala, že při nedostatku fosfátu vykazuje tabák zvýšenou phytásovou aktivitu. Kyselina phytová je důležitým zdrojem fosfátových iontů v semenech a pylu, vyskytuje se ale také ve zvýšeném množství v půdě. V půdě s nízkým obsahem fosfátu kořeny tabáku vylučují zvýšené množství kyselých fosfatů, která phytát defosforylují.^[5]

Účinky kyseliny phytové a phytas ve výživě lidí a zvířat závisí na interakci kyseliny phytové s proteiny, vitamíny a minerály a tím omezují jejich biologickou dostupnost.^[14]

Fosfoglykolátfosfatasa (EC 3.1.3.18) je enzym, který má úplnou substrátovou specifitu. Patří do skupiny hydrolas. Katalyzuje přeměnu P - glykolátu na glykolát, konkrétně přeměna 2 molekul 2-P-glykolátu na 2 molekuly glykolátu odštěpením 2 molekul fosfátu. 2-P-glykolát vzniká oxidací ribulosa 1,5-bis fosfátu společně s 3-P-glycerátem. Tato reakce je součástí fotorespirační dráhy v chloroplastech rostlin.^[4]

3-fosfoglycerátfosfatasa (EC 3.1.3.38) je enzym, který se vyskytuje v mnoha rostlinných druzích. Z molekuly 3-fosfoglycerátu, který slouží jako substrát, se odštěpuje fosfát a právě 3-fosfoglycerátfosfatasa katalyzuje toto štěpení. Preferuje tento substrát, ale dokáže katalyzovat hydrolýzu i dalších fosfoesterů. Je součástí fotosyntetické asimilace CO₂. Patří do skupiny hydrolas.^[4]

1.3.2.2. Extracelulární a intracelulární kyselé fosfatasy

Extracelulární fosfatasy katalyzují hydrolýzu různých organických fosfomonoesterů a proto jsou důležité v mineralizaci organického fosfátu v půdě a výživě rostlin. Nacházejí se v buněčných stěnách nebo jsou vylučovány povrchem kořenů do okolní půdy.^{[8] [11]}

Velmi důležitou skupinou kyselých fosfatů jsou purpurové kyselé fosfatasy (EC 3.1.3.2). Patří do velké skupiny binukleárních metaloenzymů a katalyzují hydrolýzu mnoha fosfátových esterů. Jsou snadno odlišitelné díky tomu, že jejich roztok má fialové zabarvení. U rostlin je toto zbarvení způsobeno přítomností železitých a zinečnatých iontů na aktivním centru. Jejich fyziologická funkce ještě není zcela známa.^{[9] [15] [16]}

Intracelulární kyselé fosfatasy se vyskytují téměř všude. Jejich přítomnost byla dokázána v semenech, listech, stoncích i kořenech, květech, plodech i zásobních hlízách rostlin.^[11]

1.3.3. PROTEINFOSFATASY

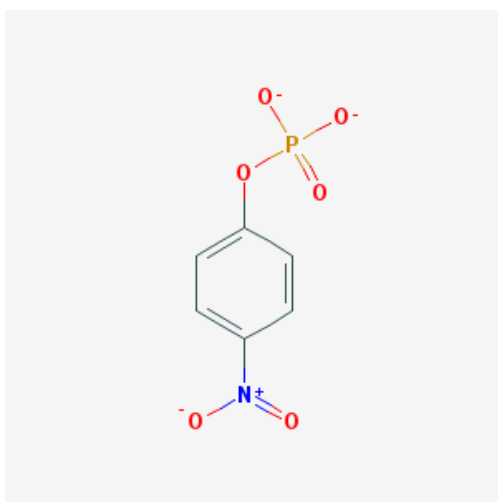
Proteinové fosfatasy (EC 3.1.3.16) ovlivňují metabolismus rostlin i dalších organismů jak krátkodobě, tak dlouhodobě. Jsou součástí mnoha signálních drah a zapojují se například do odpovědi rostlin na stresové podmínky.^[17]

Proteinfofosfatasy se dělí podle jejich substrátové specifity na fosfatasy defosforylující serylové a threonylové zbytky a na fosfatasy, které defosforylují zbytky aminokyseliny tyrosinu.^[5] Protein tyrosin fosforylace hraje důležitou roli v mnoha signálních drahách vedoucí k růstu buněk a diferenciaci.^[18]

Proteinfosfatasy 1 a 2A (PP1 a PP2A) byly zjištěny v různých rostlinných buňkách. Jejich přítomnost či rozpustnost v těchto buňkách závisí na druhu rostlin. V extraktech z listů hrachu jsou PP1 a PP2A téměř rozpustné. Na membráně nebo stromatu chloroplastů není vykazována žádná aktivita PP1 a PP2A. Jednou z funkcí proteinové fosfatasy typu 2A je také defosforylace fosfoenolpyruvát karboxylasy. ^{[5][17]}

1.3.3.1. Aktivita fosfatasy a jejich výzkum

Rostlinné fosfatasy jsou velmi rozmanité a všudypřítomné a jejich přesné fyziologické role je těžké určit. Nejpoužívanějším substrátem pro zkoumání fosfatasy je *para* – nitrofenylfosfát. ^[11]

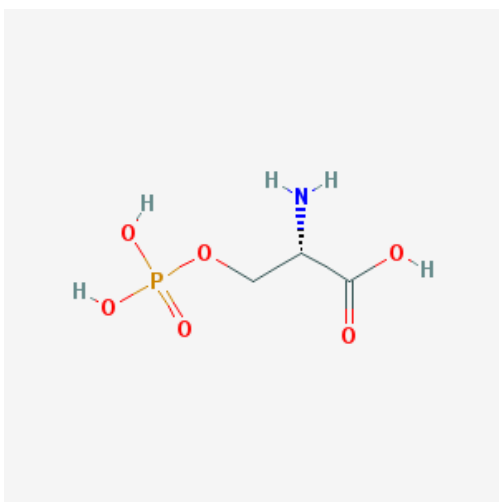


Obrázek 3 : Struktura *para* - nitro fenyl fosfátu ^[19]

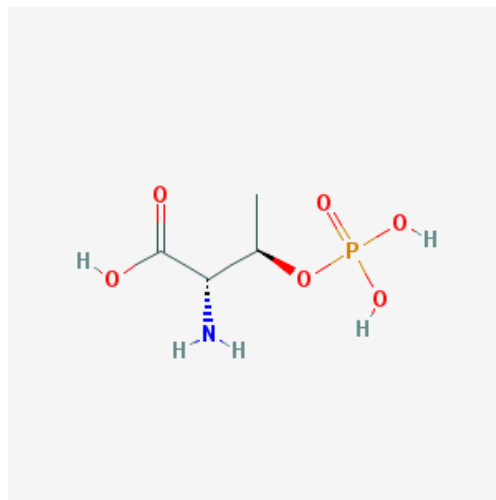
Fosfatasy jsou ovlivňovány ionty kovů. Vlivem hořečnatých a vápenatých iontů dochází ke zvýšení enzymové aktivity. Zinečnaté, železité a měďnaté ionty naopak způsobují snížení aktivity, stejně tak ionty olova, orthofosfát, askorbát, glutamát a aspartát. ^[5]

Některé kyselé fosfatasy jsou aktivní vůči fosforylovaným aminokyselinám a fosfoproteinům jako je P – serin nebo P – threonin.

Důležitou skupinou jsou protein tyrosin fosfatasy, což jsou enzymy, které defosforylují tyrosinový zbytek. Nejen že ovlivňují metabolismus buňky, ale také se uplatňují jako signální přenašeče. PTP dokáží defosforylovat Ser/Thr zbytky. ^[20]



Obrázek 1 : Struktura fosfoserinu ^[21]



Obrázek 2 : Struktura fosfothreoninu ^[22]

2. CÍL PRÁCE

Cílem této práce bylo:

1. Připravit extrakty z listů tabáku a hrachu setého s fosfátasovou aktivitou.
2. Charakterizovat připravené enzymové preparáty z hlediska pH optima a teplotního optima vzhledem k substrátům pNP – fosfát a fosfo – L serin.

3. MATERIÁL A METODY

3.1. MATERIÁL A PŘÍSTROJE

3.1.1. ROSTLINNÝ MATERIÁL

Rostliny *Nicotiana tabacum* L. cv. Petit Havana, SR1, poskytnuty doc. RNDr. Helenou Ryšlavou CSc., katedra biochemie Univerzity Karlovy v Praze.

Rostliny *Pisum sativum*, vypěstovány mou osobou.

3.1.2. CHEMIKÁLIE

4-nitrophenylfosfát disodná sůl hexahydrátu (pNP-fosfát) – Fluka, Velká Británie

Kyselina citrónová – Lachema, ČR

Kyselina sírová – Lachner, ČR

Citronan sodný – Penta, ČR

Polyvinylpyrrolidon (PVP) – Sigma, USA

Fosfo – L – serin – Sigma, USA

Hydrogenuhlíčitan sodný – Penta, ČR

Dihydrogenuhlíčitan sodný – Penta, ČR

Siřičitan sodný – Lachema, ČR

Molybdenan amonný – Lachema, ČR

Hydroxid sodný – Purum, ČR

Hydroxid draselný – Purum, ČR

3.1.3. PŘÍSTROJE

Analytické váhy 100A – Denver Instrument Company, USA

Centrifuga Univerzal 32 R – Hettich, Německo

Inkubátor se suchou lázní Ellite – Schoeller instruments, Velká Británie

Spektrofotometr Ultrospec 2100 – Amersham Pharmacia Biotech, Velká Británie

pH metr UB – 10 – Denver Instrument Company, USA

3.2. METODY A POSTUP

3.2.1. PŘÍPRAVA ENZYMU

3.2.1.1. Homogenizace a extrakce

Při extrakci daného rostlinného materiálu je rozhodující prostředí, ve kterém se materiál extrahuje. Toto prostředí ovlivňuje aktivitu enzymu. Důležitou roli hraje použitý pufr a pH, ale také přidané látky, které pomáhají zachovat aktivitu enzymu.

Nejdříve jsem daný rostlinný materiál homogenizovala. Navážku listu rostlinného materiálu, přibližně 0,5 g, jsem převedla do porcelánové misky. Přidala jsem malé množství PVP, který váže fenolické látky, které zůstávají v sedimentu. Materiál jsem rozmělnila a přidala trojnásobek navážky listů v ml objemu extračního 100 mM citrátového pufru pH 5,4.

Homogenát jsem převedla do Eppendorfovy mikrozkušavky a centrifugovala 15 minut při 15 000 g, 4 °C.

Pro další postup jsem supernatant přelila do další mikrozkušavky a uchovala pro další měření.

3.2.2. STANOVENÍ FOSFATASOVÉ AKTIVITY

Při měření fosfatasové aktivity jsem používala jako substrát *p*NP – fosfát, fosfoderivát chromoforu *para* – nitrofenolu (*p*NP). Díky jeho žlutému zabarvení lze po odštěpení fosfátové skupiny měřit absorbanci při vlnové délce 405 nm.

Do reakční směsi jsem přidala 155 μ l 100 mM citrátového pufru pH 5,4 a 20 μ l 20mM *p*NP – fosfátu. Reakce byla zahájena přidáním 25 μ l připraveného rostlinného extraktu. Reakci jsem ukončila přidáním 800 μ l 0,1 M borátového pufru pH 9,0. U fosfatasy tabáku po 10 minutách, u fosfatasy hrachu po 1 minutě.

Připravovala jsem referenční vzorek k měření absorbance. Nejdříve bylo přidáno k reakční směsi 800 μ l 0,1 M borátového pufru pH 9,0 k „zastavení reakce“ a až následně přidán rostlinný extrakt.

Reakce probíhala v termostatu při teplotě 36 °C v Eppendorfových mikrozkuvkách. Vzorky jsem před samotnou reakcí nechala vytemperovat 10 minut v termostatu.

Následně jsem měřila spektrofotometricky absorbanci při vlnové délce 405 nm vzhledem k referenčním vzorkům.

3.2.2.1. Stanovení množství *p*NP - fosfátu hydrolyzovaného fosfatasou na čase

Pro stanovení množství produktu v závislosti na čase jsem reakční směs s daných rostlinným vzorkem inkubovala v termostatu při 36 °C 1, 5, 10, 20 a 30 minut. Po těchto časových úsecích bylo přidáno 800 μ l 0,1 M borátového pufru pH 9,0.

Změřila jsem absorbanci při 405 nm.

3.2.2.2. Stanovení množství vzniklého produktu v závislosti na množství enzymu

Pro stanovení množství produktu v závislosti na množství enzymu byl vždy k reakční směsi přidán různý objem daného rostlinného extraktu. Reakční směs obsahovala 20 μ l 20 mM *p*NP – fosfátu a postupně 5, 10, 20, 25 a 50 μ l rostlinného enzymu. Před samotnou aktivací rostlinným enzymem byl přidán 100 mM citrátový pufr v takovém objemu, aby výsledný objem reakční směsi byl 200 μ l.

Reakce byla ukončena přidáním 800 μ l 0,1 M borátového pufru pH 9,0.

Reakce probíhala při teplotě 36 °C. Vzorky byly před samotnou reakcí inkubovány v termostatu při téže teplotě 10 minut.

Změřila jsem absorbanci při 405 nm.

3.2.2.3. Stanovení rychlosti reakce katalyzované fosfatasou na koncentraci substrátu

Pro stanovení rychlosti reakce katalyzované fosfatasami v závislosti na množství substrátu byl vždy v reakční směsi přítomen různý objem 20 mM *p*NP – fosfátu, který jsem používala jako substrát. Koncentrace *p*NP – fosfátu v reakční směsi byly v rozmezí 1 – 10 mM. Reakční směs byla doplněna na 175 μ l 100 mM citrátovým pufrem pH 5,4. Následně bylo přidáno 25 μ l rostlinného enzymu.

Reakce byla ukončena přidáním 800 μ l 0,1 M borátového pufru pH 9,0.

Reakce probíhala při teplotě 36 °C. Vzorky byly 10 minut temperovány před samotnou reakcí při stejné teplotě.

Změřila jsem absorbanci při 405 nm. Následně jsem vypočítala K_m a V_{max} pomocí nelineární regrese v programu MS Excel.

3.2.2.4. Stanovení aktivity fosfatasy v závislosti na pH

Pro získání požadované škály pH jsem připravila řadu 100 mM citrátových pufrů o pH 3,0 – 6,5. Do reakční směsi jsem přidala 155 μ l 100 mM citrátového pufru o daném pH a 20 μ l 20mM *p*NP – fosfátu. Reakce byla zahájena přidáním 25 μ l rostlinného vzorku a ukončila jsem jí přidáním 800 μ l 0,1 M borátového pufru pH 9,0.

Reakce probíhala při teplotě 36 °C. Vzorky byly před samotnou reakcí 10 minut temperovány v inkubátoru při téže teplotě.

Změřila jsem absorbanci při 405 nm.

3.2.2.5. Stanovení fosfatasové aktivity v závislosti na teplotě

Pro stanovení fosfatasové aktivity v závislosti na teplotě jsem připravila reakční směs, která obsahovala 155 μ l 100 mM citrátového pufru pH 5,4, 20 μ l 20 mM *p*NP – fosfátu a 25 μ l rostlinného enzymu.

Reakce byla ukončena přidáním 800 μ l 0,1 M borátového pufru pH 9,0.

Následně byla změřena absorbance při vlnové délce 405 nm.

3.2.3. *STANOVENÍ FOSFATASOVÉ AKTIVITY VŮČI DALŠÍMU SUBSTRÁTU*

Jako další substrát jsem použila fosfo – L - serin.

3.2.3.1. **Stanovení volného fosfátu**

Měření fosfatasové aktivity vůči fosfo - L - serinu je založeno na stanovení volného fosfátu, který vznikl při odštěpení.

Volný fosfát při reakci reaguje s molybdenanem amonným, kdy se tvoří komplex $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{MoO}_4$. Ten je redukován na barevný komplex, jehož přítomnost lze měřit absorbancí při vlnové délce 660 nm.

Zásobní 10 mM fosfátový pufr se skládá z 1,791 g hydrogenfosforečnanu sodného, 0,690 g dihydrogenfosforečnanu sodného a doplněno na 250 ml destilovanou vodou.

Redukční činidlo se skládá z 0,2 g 1 amino-2-naftol-4-sulfonové kyseliny, 1,2 g hydrogenuhlíčitanu sodného a 1,2 g siřičitanu sodného. Roztok redukčního činidla jsem připravovala vždy čerstvě před měřením rozpuštěním 0,025 g v 1 ml destilované vody.

Při stanovování volného fosfátu jsem do 200 μl vzorku přidala 100 μl 5 M kyseliny sírové, která zastavila reakci. Dále jsem přidala 200 μl 2% molybdenanu amonného, 10 μl redukčního činidla a 490 μl destilované vody v přesném pořadí.

Detekci fosfátu jsem nechala stát 15 minut a poté jsem změřila absorbanci směsi při vlnové délce 660 nm.

3.2.3.1.a. *Množství uvolněného fosfátu katalyzovaného fosfatasou v závislosti na čase*

Připravila jsem si roztoky fosfátu v rozmezí koncentrací 0,2 – 1 mM. Odebrala jsem 200 μ l pufru o dané koncentraci do Eppendorfovy zkumavky, přidala 100 μ l 5 M kyseliny sírové, 200 μ l 2% molybdenanu amonného, 10 μ l redukčního činidla a 490 μ l destilované vody. Reakci jsem nechala probíhat a v časových intervalech měřila absorbanci směsi při vlnové délce 660 nm.

3.2.3.1.b. *Štěpení fosfo – L serinu fosfatasy v závislosti na pH*

Pro získání požadované škály pH jsem připravila řadu 100 mM citrátových pufrů o pH 4,0 – 8,0. Do reakční směsi jsem přidala 100 μ l 100 mM citrátového pufru o daném pH a 20 μ l 20 mM fosfo - L serinu. Reakce byla zahájena přidáním 25 μ l rostlinného vzorku. Reakce probíhala 10 minut při teplotě 36 °C. Vzorky byly inkubovány před samotnou reakcí 10 minut v termostatu.

Nechala jsem probíhat detekci volného fosfátu a změřila absorbanci.

3.2.3.1.c. *Rychlost reakce katalyzované fosfatasou na koncentraci substrátu*

V reakční směsi byl přítomen různý objem 20 mM fosfo – L serin, který jsem používala jako substrát. Reakční směsi postupně obsahovaly 5, 10, 20, 30, 50 a 70 μ l 20 mM fosfo – L serinu, 100 μ l 100mM citrátového pufru a byly doplněny na 175 μ l destilovanou vodou. Následně bylo přidáno 25 μ l rostlinného enzymu, čímž došlo k aktivaci reakce. Výsledná reakční směs měla objem 200 μ l. Reakce probíhala 10 minut při teplotě 36 °C. Vzorky byly inkubovány před samotnou reakcí 10 minut v termostatu.

Nechala jsem probíhat detekci volného fosfátu a změřila absorbanci.

4. VÝSLEDKY

V této práci jsem charakterizovala fosfatasovou aktivitu v listech tabáku a hrachu setého. Jako substráty jsem používala *para* – nitrofenylfosfát a fosfo-L-serin.

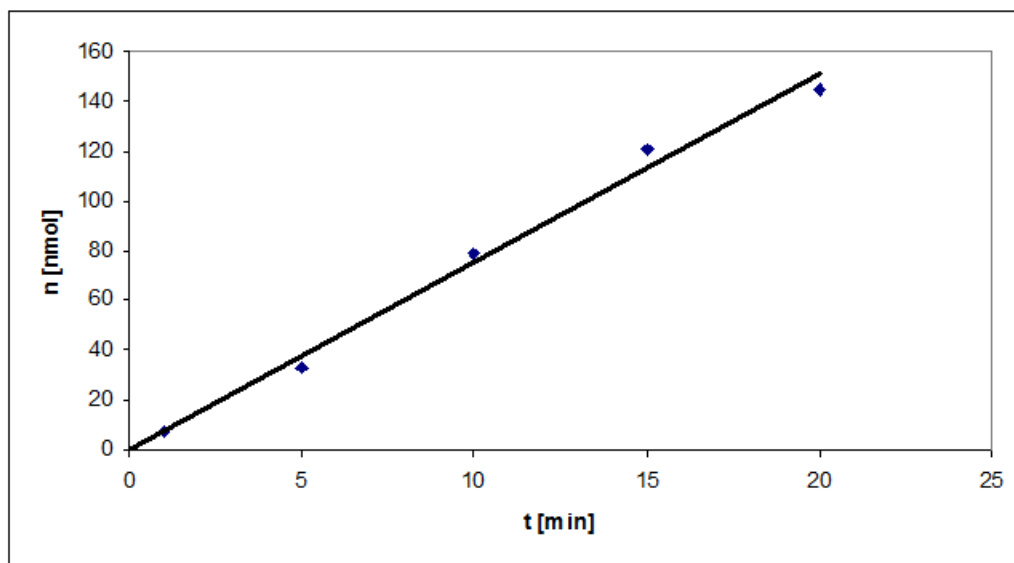
4.1. PŘÍPRAVA ENZYMOVÉHO EXTRAKTU

4.1.1. ŠTĚPENÍ *pNP* -FOSFÁTU FOSFATASOU ZA URČITOU DOBU

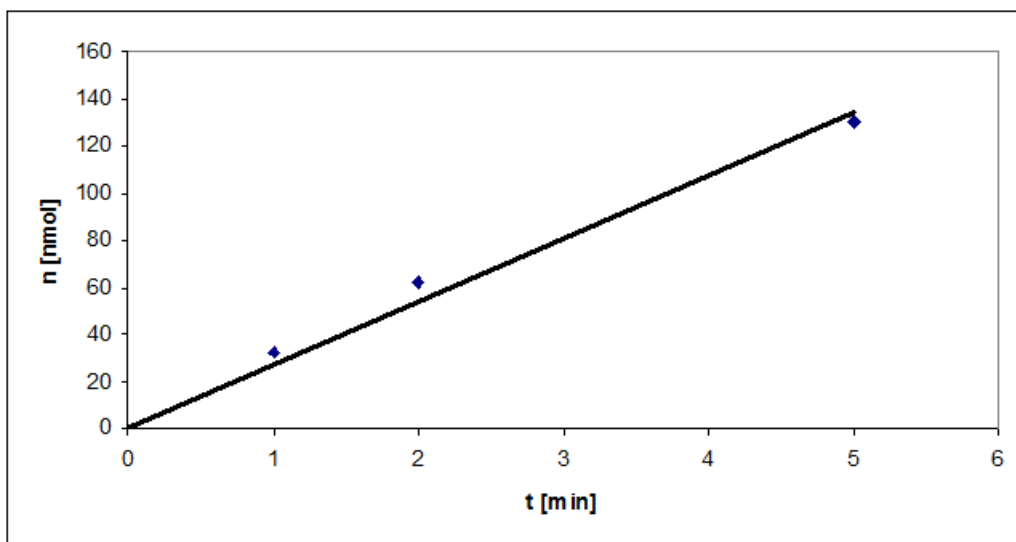
Stanovovala jsem časový průběh štěpení *pNP* – fosfátu metodou popsanou v kapitole 3.2.2.1.

Na obr. 4 je vidět, že přírůstek *pNP* je lineární a nedochází k jeho zpomalení. Pro další měření jsem použila jako reakční dobu 10 minut.

Na obr. 5 je patrné, že přírůstek *pNP* je také lineární, ale jeho množství se zvyšuje velmi intenzivně. Pro další měření jsem použila reakční dobu 1 minutu.



Obrázek 4 : Závislost množství produktu *pNP* vzniklého defosforylací *pNPP* na čase (fosfatasa tabáku).

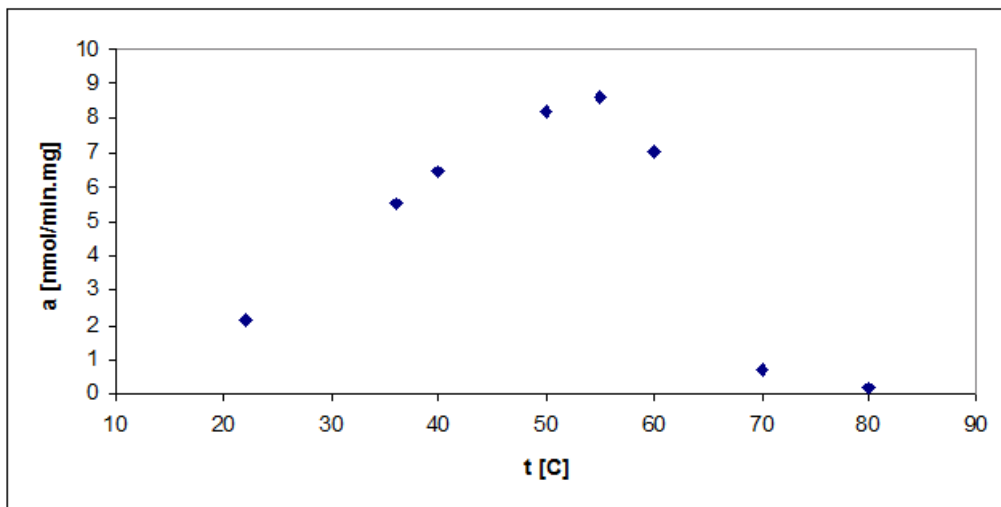


Obrázek 5 : Závislost množství produktu *p*NP vzniklého defosforylací *p*NPP na čase (fosfatasa hrachu).

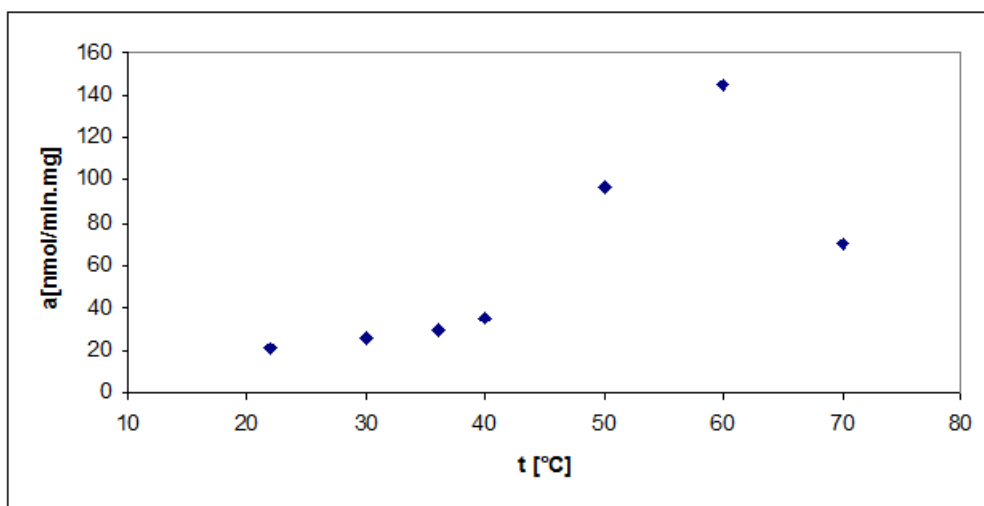
4.1.2. STANOVENÍ AKTIVITY FOSFATASY V ZÁVISLOSTI NA TEPLITĚ

Stanovovala jsem fosfatasovou aktivitu v závislosti na teplotě v reakční směsi metodou popsanou v kapitole 3.2.2.5. Použila jsem *p*NP - fosfát jako substrát.

Obr. 10 a obr. 11 zobrazují průběh aktivity v závislosti na teplotě. Křivka na obr. 11 průběžně roste až do hodnoty 60 °C a následně prudce klesá. Při hodnotě 80 °C je enzym inaktivní. Na obr. 10 je vidět, že teplotní maximum fosfatasy tabáku je 55 °C. Aktivita fosfatasy nepatrně klesne při 60 °C . Při vyšších teplotách je enzymová aktivita zanedbatelná, při 80°C je enzym inaktivní.



Obrázek 10 : Graf závislosti aktivity fosfatasy tabáku na teplotě



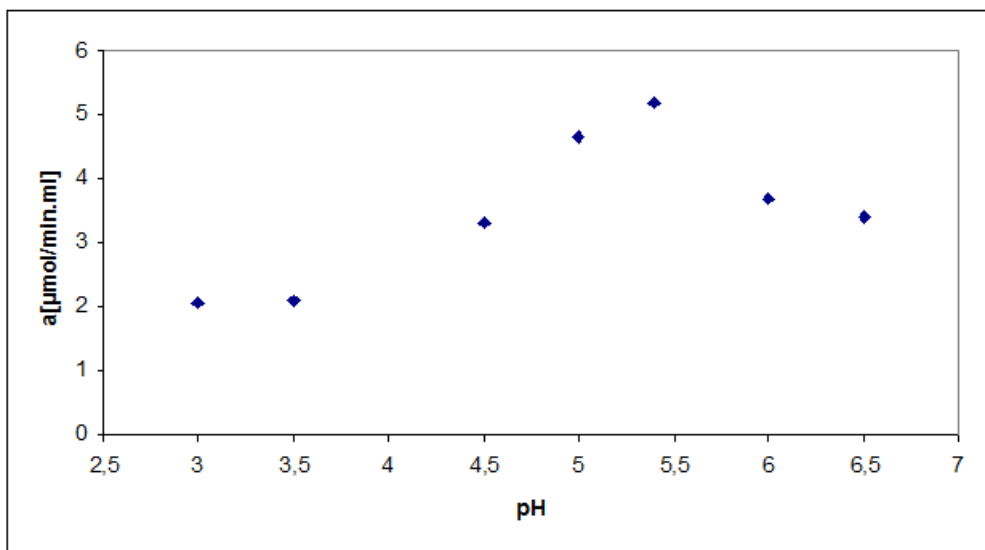
Obrázek 11 : Graf závislosti aktivity fosfatasy hrachu na teplotě

4.1.3. STANOVENÍ AKTIVITY FOSFATASY V ZÁVISLOSTI NA pH

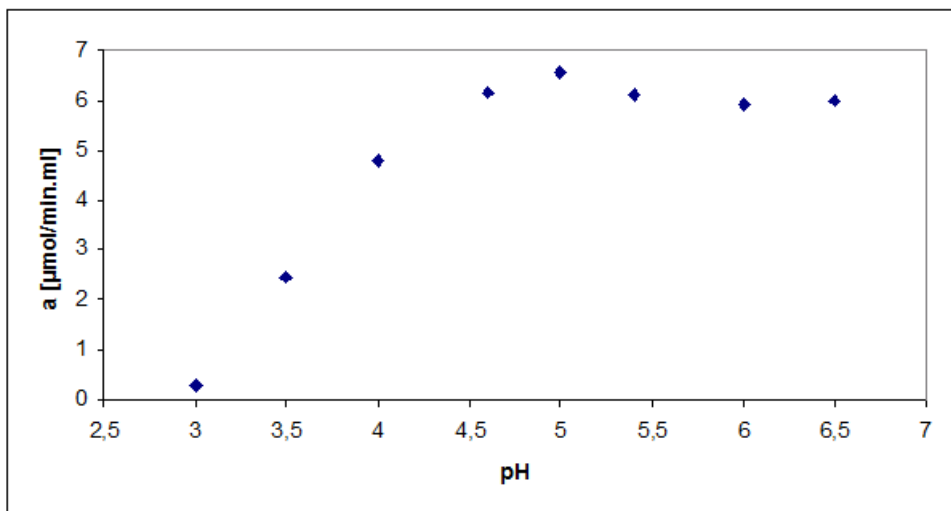
Stanovovala jsem fosfatasovou aktivitu v závislosti na pH v reakční směsi metodou popsanou v kapitole 3.2.2.4. Použila jsem *p*NP - fosfát jako substrát.

Na obr. 8 je vidět, že pH optimum fosfatasy tabáku leží při hodnotě pH 5,4. Následně výrazně klesá. Fosfatasová aktivita hrachu je nejvyšší při hodnotě pH 5,0 a pak pozvolna klesá a zůstává konstatní (obr. 9).

Fosfatasová aktivita tabáku se až do hodnoty pH 5,4 postupně zvyšuje, následně dosahuje svého maxima. Aktivita fosfatasy hrachu se zvyšuje výrazně prudčeji. Při nižším pH než 3,0 je enzym inaktivní.



Obrázek 8 : Graf závislosti aktivity fosfatasy tabáku na pH pufru

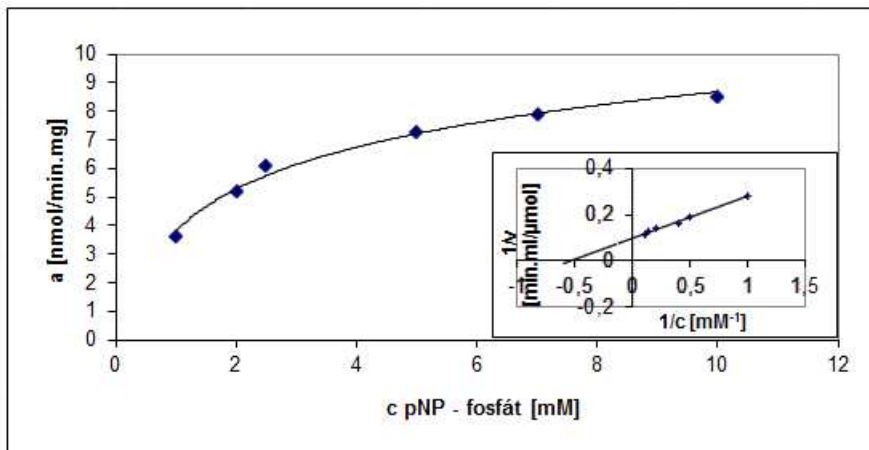


Obrázek 9 : Graf závislosti aktivity fosfatasy hrachu na pH pufru

4.1.4. ZÁVISLOST RYCHLOSTI REAKCE KATALYZOVANÉ FOSFATASOU NA KONCENTRACI SUBSTRÁTU *p*-NPP

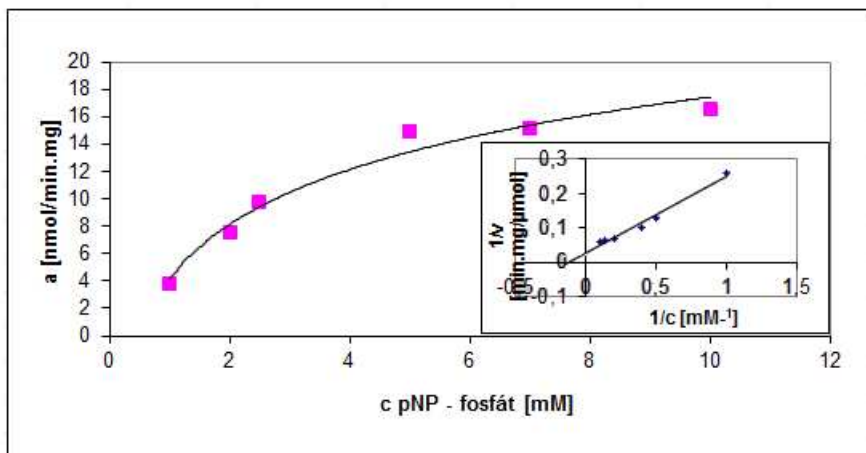
Sledovala jsem závislost rychlosti reakce na koncentraci substrátu v reakční směsi metodou popsanou v kapitole 3.2.2.3.

Rychlost reakce katalyzované fosfatasami tabáku a hrachu v obou případech roste. Zvyšuje se při vyšších koncentracích substrátu *p*NP – fosfátu. Průběh křivky je hyperbolický. Dvojitým reciprokým vynesáním podle Lineweara a Burkea byly spočítány kinetické konstanty K_m a V_{max} (tabulka 1).



Obrázek 6 : Závislost rychlosti reakce katalyzované fosfátasou tabáku na koncentraci substrátu.

Dvojnásobné reciproké vynesení podle Lineweara a Burkea závislosti rychlosti reakce katalyzované fosfátasovou aktivitou tabáku na koncentraci *p*NP-fosfátu (vložený obrázek).



Obrázek 7 : Závislost rychlosti reakce katalyzované fosfátasou hrachu na koncentraci substrátu .

Dvojnásobné reciproké vynesení podle Lineweara a Burkea závislosti rychlosti reakce katalyzované fosfátasovou aktivitou hrachu na koncentraci *p*NP-fosfátu (vložený obrázek).

Michaelisova konstanta i maximální reakční rychlost je v případě fosfatasy hrachu vyšší než u fosfatasy tabáku. Přesné hodnoty K_m a V_{max} vykazuje tabulka 1.

Tabulka 1: Kinetické parametry (K_m – Michaelisova konstanta, V_{max} – maximální rychlost reakce) fosfatasové aktivity tabáku a hrachu pro substrát *p*NP-fosfátu.

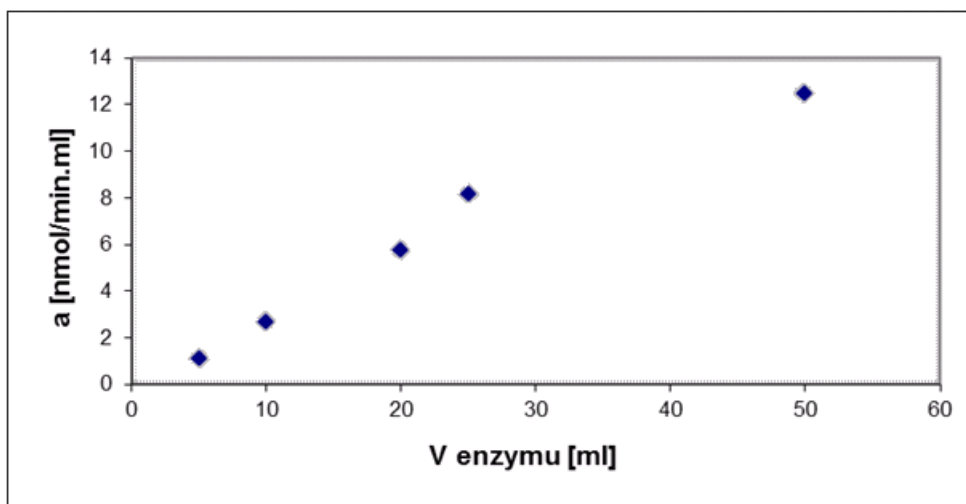
fosfatasa	K_m [mM]	V_{max} [μ mol/min.ml]
tabák	1,8	10,0
hrách setý	8,5	38,0

4.1.5. STANOVENÍ MNOŽSTVÍ VZNIKLÉHO PRODUKTU V ZÁVISLOSTI NA MNOŽSTVÍ ENZYMU

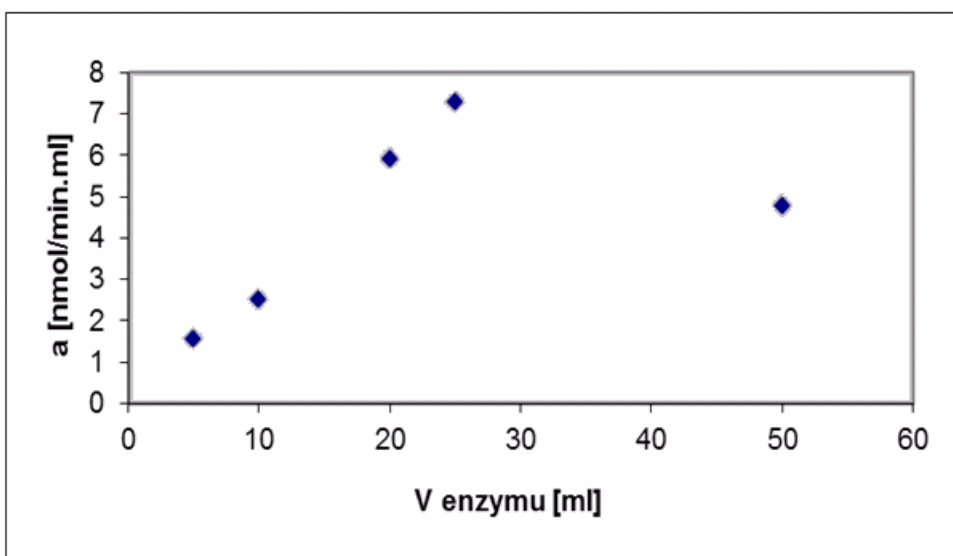
Sledovala jsem závislost množství vzniklého produktu katalyzovaného fosfatasou na množství enzymu v reakční směsi metodou popsanou v kapitole 3.2.2.2.

Jak v případě fosfatasy tabáku, tak v případě fosfatasy hrachu dochází k vzestupu aktivity v závislosti na koncentraci enzymu. Aktivita fosfatasy hrachu při vysokém množství enzymu klesá.

Optimální množství enzymu v obou případech je 25 μ l, které jsem také používala u všech ostatních měření. Průběh závislosti aktivity fosfatas na množství enzymu je v obou případech totožný.



Obrázek 12 : Graf závislosti aktivity fosfatasy tabáku na množství enzymu

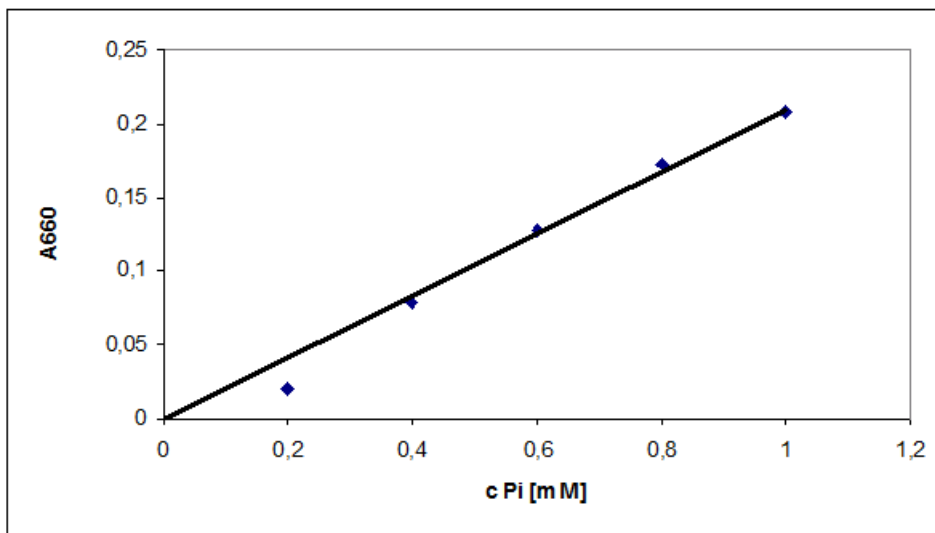


Obrázek 13 : Graf závislosti aktivity fosfatasy hrachu na množství enzymu

4.2. STANOVENÍ VOLNÉHO FOSFÁTU

Měřila jsem fosfatasovou aktivitu vůči substrátu fosfo – L serinu.

Nejdříve jsem sestrojila kalibrační křivku roztoků fosfátových pufrů o koncentraci 0,2 – 1 mM (obrázek 14).

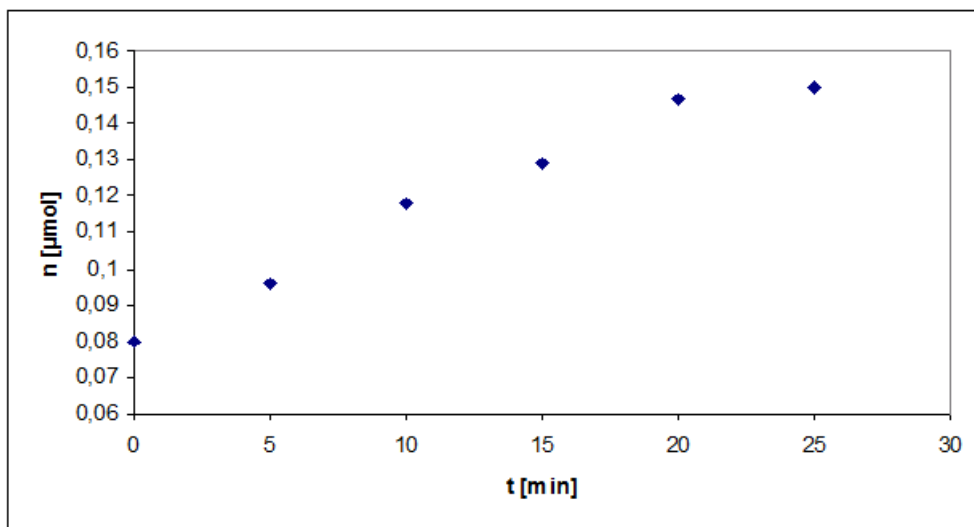


Obrázek 14 : Kalibrační křivka pro stanovení volného fosfátu

4.2.1. ZÁVISLOST MNOŽSTVÍ UVOLNĚNÉHO FOSFÁTU KATALYZOVANÉHO FOSFATASOU NA ČASE

Sledovala jsem časový průběh štěpení fosfo – L serinu při reakci katalyzované fosfatasami hrachu. Metoda je popsána v kapitole 3.2.3.1.a.

Na obr. 15 je vidět, že přírůstek volného fosfátu je lineární až do času 20 minut, následně dochází ke zpomalení. Další měření jsem prováděla v intervalu 15 minut.

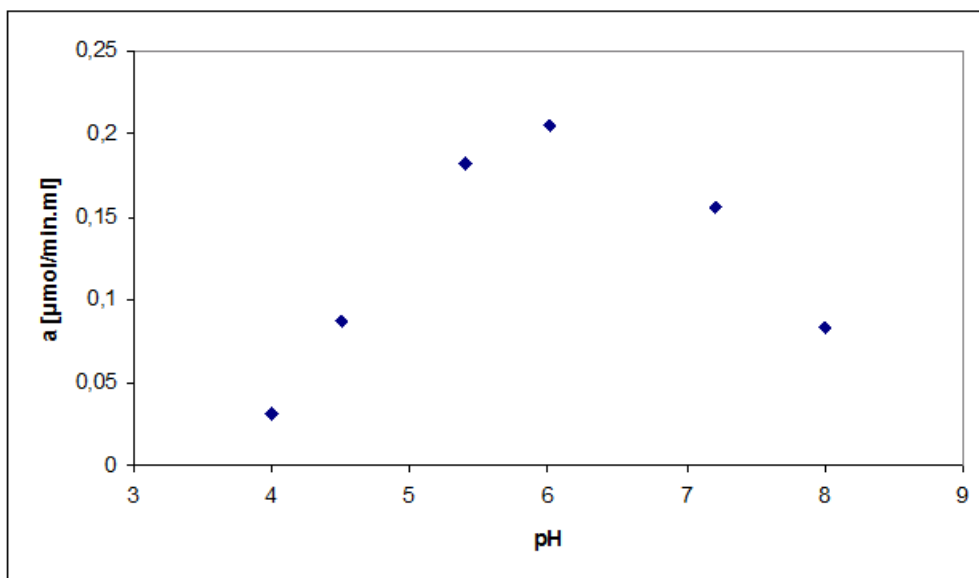


Obrázek 15 : Závislost množství uvolněného fosfátu na čase při štěpení fosfo – L serinu fosfatasami hrachu.

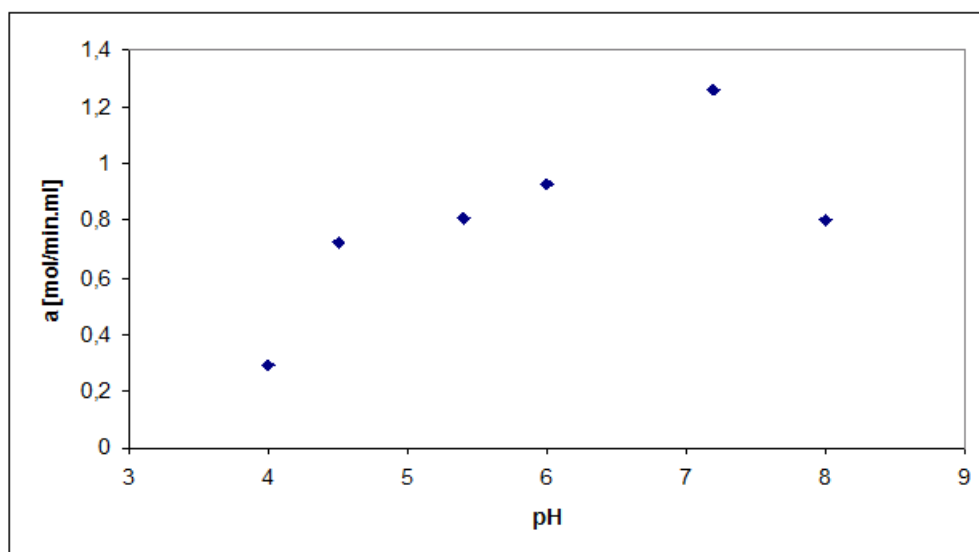
4.2.2. STANOVENÍ AKTIVITY FOSFATASY V ZÁVISLOSTI NA pH

Aktivitu fosfatasy tabáku a hrachu jsem stanovovala při rozsahu pH 4,0 – 8,0.

Na obr. 16 je vidět nárůst aktivity v mírně kyselém prostředí fosfátového pufru s pH optimem 6,0. Na obr. 17 je možno pozorovat také nárůst v kyselé oblasti ovšem méně strměji, pH optimum je v tomto případě 7,0. Směrem k alkalické oblasti je pokles jak u fosfatasy hrachu, tak u fosfatasy tabáku prudší než směrem k oblasti kyselé. Závislost aktivity fosfatasy hrachu a aktivity fosfatasy tabáku na pH je velmi podobná, liší se jen v pH optimu.



Obrázek 16 : Závislost aktivity fosfatasy tabáku na pH pro substrát fosfo – L serin.

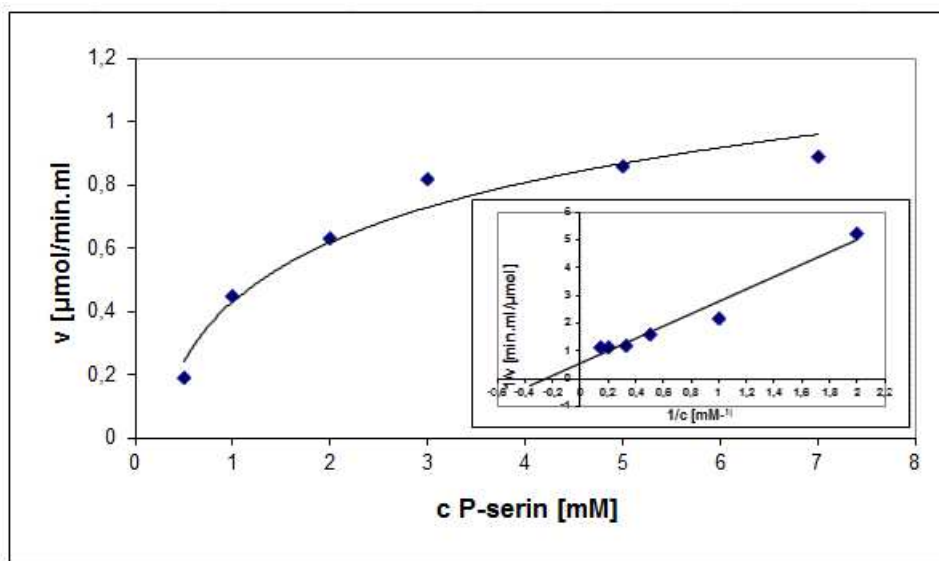


Obrázek 17 : Závislost aktivity fosfatasy hrachu na pH pro substrát fosfo – L serin.

4.2.3. ZÁVISLOST RYCHLOSTI REAKCE KATALYZOVANÉ FOSFATASOU NA KONCENTRACI SUBSTRÁTU FOSFO – L - SERINU

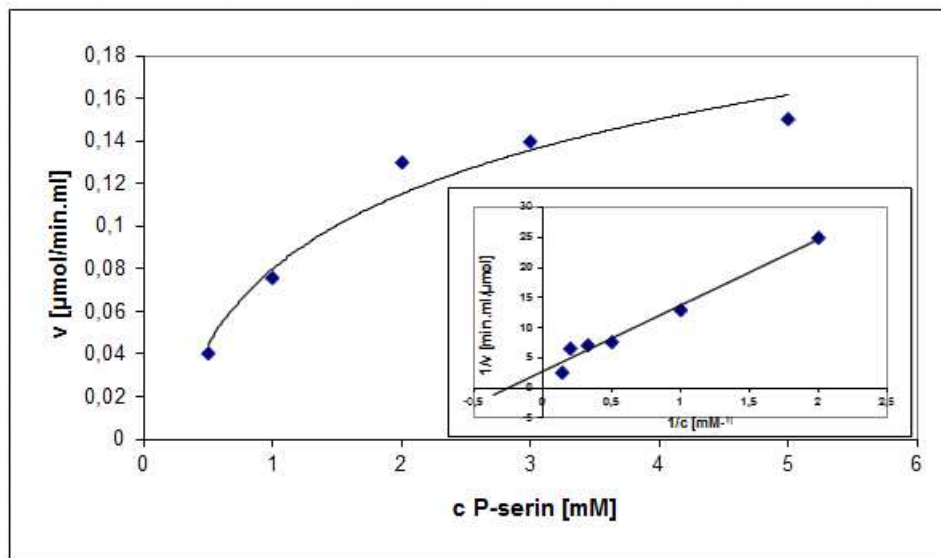
Na ob. 18 a obr. 19 je znázorněna hyperbolický průběh křivek závislosti rychlosti reakce katalyzované fosfatasami tabáku a hrachu na koncentraci substrátu fosfo – L serinu.

Michaelisova konstanta K_m a maximální rychlost reakce V_{max} byly stanoveny pomocí nelineární regrese (tabulka 2). Údaje byly ověřeny dvojnásobným reciprokým vynesemím podle Lineweavera a Burkea. (vložené obrázky).



Obrázek 18 : Závislost rychlosti reakce katalyzované fosfatasovou aktivitou tabáku na koncentraci substrátu fosfo – L serin .

Dvojnásobné reciproké vynesení podle Lineweava a Burkea závislosti rychlosti reakce katalyzované fosfatasovou aktivitou tabáku na koncentraci substrátu fosfo – L serinu (vložené obrázek).



Obrázek 19 : Závislost rychlosti reakce katalyzované fosfatasovou aktivitou hrachu na koncentraci substrátu fosfo – L serin .

Dvojnásobné reciproké vynesení podle Lineweara a Burkea závislosti rychlosti reakce katalyzované fosfatasovou aktivitou hrachu na koncentraci substrátu fosfo – L serinu (vložený obrázek).

Afinita fosfatasy hrachu je stejná jako v případě fosfatasy tabáku, Michaelisova konstanta je 4,0 mM. Naopak maximální reakční rychlost je u fosfatasy tabáku téměř 5x větší než u fosfatasy hrachu. (tabulka 2)

Tabulka 2: Kinetické parametry (K_m – Michaelisova konstanta, V_{max} – maximální rychlost reakce) fosfatasové aktivity tabáku a hrachu pro substrát fosfo – L serin.

rostlinný materiál	K_m [mM]	V_{max} [μmol/min.ml]
tabák	4,0	1,8
hrách setý	4,0	0,4

5. DISKUZE

Fosfor je důležitý prvek pro růst rostlin a vyskytuje se v nich ve formě fosfátových iontů P_i .

Hydrolyzu monoesterů fosfátu zprostředkovávají enzymy fosfatasy.

Fosfatasy jsou enzymy vyskytující se v živých organismech, kde mají různé role. Dělí na kyselé a alkalické fosfatasy dle jejich pH optima.^{[1] [5] [14]}

Kyselé fosfatasy můžeme rozdělit na enzymy bez substrátové specifity a na specializované.

Některé kyselé fosfatasy jsou aktivní vůči fosforylovaným aminokyselinám a fosfoproteinům jako je fosfo – serin nebo fosfo – threonin.^{[1] [21]}

Průběh závislosti aktivity fosfatasy na teplotě je odlišný v případě hrachu a tabáku. U

fosfatasy tabáku aktivita prudce stoupá se zvyšující se teplotou až dosahuje maxima při teplotě 50 °C a následně při teplotě 60 °C mírně klesá. Při vyšších teplotách je enzym téměř inaktivní.

U fosfatasy hrachu je vzestup aktivity v závislosti na teplotě mnohem pozvolnější, dosahuje maxima při 60 °C a následně pozvolna klesá.

Fosfatasová aktivity v listech tabáku vykazovala teplotní optimum 55 °C, fosfatasová aktivita v hrachu setého má teplotní optimum při 60 °C.

Zjištěné teplotní optimum fosfatasy tabáku je velmi podobné výsledkům stejného experimentu již publikovaného (pH optimum 60 °C).^[14] (4.2.2. Vliv teploty na fosfatasovou aktivitu)

pH optima fosfatasové aktivity tabáku i hrachu se se substrátem *p*NP - fosfát nacházejí

v kyselé oblasti. Přesněji u tabáku je to pH 5,4, u hrachu pH 5,0. Obdobné pH optimum

fosfatasy tabáku (pH 5,5) opět publikováno ve stejném experimentu.^[14] (4.2.1. Vliv prostředí na fosfatasovou aktivitu)

S nízkomolekulárním substrátem fosfo – L serinem se pH optima nacházejí jinde. Fosfatasová aktivita tabáku se prudce zvyšuje v kyselém prostředí až dosáhne maxima v hodnotě pH 6,0.

Následně fosfatasová aktivita stejně prudce klesá.

Fosfatasová aktivita hrachu postupně roste se zvyšujícím se kyselostí roztoku, ve kterém se nachází až do hodnoty pH 7,0, kdy dosahuje pH optima. V zásaditém prostředí klesá.

Obecně se dá tedy říct, že prostředí nízkomolekulárního substrátu fosfo – L serinu fosfatasová aktivita tabáku i hrachu vykazuje kyselejší pH optima než je tomu za stejných podmínek reakční směsi u substrátu *p*NP – fosfátu.

Množství enzymu v reakční směsi má také vliv na aktivitu fosfatas tabáku a hrachu. V obou případech je možné pozorovat stoupající lineární průběh. Čím více je enzymu v reakční směsi přítomno, tím větší fosfatasovou aktivitu můžeme pozorovat.

Vliv koncentrace substrátu na aktivitu v listech tabáku a hrachu je zajímavý. Z grafů je možno získat dvojitém reciprokým vynesením podle Lineweavera a Burkea kinetické konstanty (Michaelisova konstanta K_m a maximální reakční rychlost V_{max}) pro různé substráty.

Porovnávala jsem tyto kinetické konstanty vzhledem k substrátu *p*NP – fosfátu a fosfo – L serinu pro fosfatasy tabáku a hrachu.

Fosfatasa hrachu vykazuje nižší afinitu než fosfatasa tabáku k substrátu *p*NP – fosfátu, k substrátu fosfo – L serinu je afinita obou fosfatas stejná. Maximální reakční rychlost je vyšší v prostředí *p*NP – fosfátu než v prostředí fosfo – L serinu.

Z tabulky 3 je patrné, že reakční rychlost je několikanásobně větší s použitím *p*NP – fosfátu jako substrát.

Domnívám se tedy, že tento substrát je vhodnějším z důvodu, že reakce proběhne během stejné doby mnohem rychleji než s použitím fosfo – L serinu jako substrát.

Tabulka 3: Kinetické konstanty fosfatasy tabáku a hrachu pro různé substráty.

substrát	<i>p</i> NP – fosfát		Fosfo – L serin	
	K_m [mM]	V_{max} [μ mol/min.ml]	K_m [mM]	V_{max} [μ mol/min.ml]
tabák	1,8	10,0	4,0	1,8
hrách	8,5	38,0	4,0	0,4

Ze všech výše prezentovaných měření je zřejmé, že aktivita fosfatasy hrachu je většinou vyšší než aktivita fosfatasy tabáku. Fosfatasy hrachu jsou více citlivé na změnu podmínek, ve kterých se vyskytují.

6. ZÁVĚR

Byl připraven enzymový preparát s fosfatasovou aktivitou z listů tabáku a hrachu setého.

Bylo zjištěno, že s použitím *p*NP – fosfátu jako substrát je pH optimum fosfatasy hrachu 5,0 a tabáku 5,4. V případě fosfo – L serinu jako substrátu je pH optimum fosfatasy hrachu 6,0 a tabáku 7,0.

Teplotní optimum fosfatasy hrachu je 60 °C a fosfatasy tabáku 55 °C.

Michaelisova konstanta K_m fosfatasy tabáku 1,8 mM se substrátem *p*NP – fosfátem a 4,0 mM s fosfo – L serinem. K_m fosfatasy hrachu s použitím fosfo – L serinem je 4,0 mM a 8,5 s *p*NP – fosfátem.

Reakční rychlost fosfatasy tabáku je 10,0 $\mu\text{mol/min.ml}$ a fosfatasy hrachu 38,0 $\mu\text{mol/min.ml}$ s *p*NP – fosfátem. Při použití fosfo – L serinu je reakční rychlost fosfatasy tabáku a hrachu stejná a to 4,0 $\mu\text{mol/min.ml}$.

Aktivita fosfatasy hrachu byla vyšší než aktivita fosfatasy tabáku vůči *p*NP – fosfátu.

Fosfatasa hrachu je mnohem citlivější na změnu podmínek v reakční směsi než fosfatasa tabáku. Afinity fosfatasy tabáku a hrachu je jak pro *p*NP – fosfát, tak pro nízkomolekulární substrát fosfo – L serin stejná.

7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] Biochemie pro bakalářské studium chemie a technické chemie, Čegan A., Korecká L., FCHT, Univerzita Pardubice (2008)
- [2] Biochemie základní kurz, kolektiv autorů, PřF Univerzita Karlova (2009)
- [3] Wang, L., Li, Z., Guo W., Gao, X., Huang, L., Wang, H., Zhu, H. :, *Physiol Plant* (2010)
- [4] Heldt, H. – W., Piechulla, B., Heldt, F. : *Plant Biochemistry*, Academic Press, 4.vydání (2011)
- [5] Růžicková K. : Diplomová práce, PřF Univerzita Karlova v Praze (2011)
- [6] Barthová, J., Sofrová, D., Tichá, M. : *Základní praktikum z biochemie* (1984)
- [7] Horr A., Diplomová práce, PřF Masarykova Univerzita v Brně (2007)
- [8] Rejsek K., Vránová, V., Pavelka, M., Formánek, P. : *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 175, 196–211 (2012)
- [9] Vincent, J.B., Crowder, M.W., Averill, B.A. : *Trends Biochem. Sci.* 17, 105-110 (1992)
- [10] Štefková K., Diplomová práce, PřF Masarykova Univerzita v Brně (2009)
- [11] Surf, S.M.G., Sarath, G., Platon, W.C.: *Physiol. Plant* 90, 791-800 (1994)
- [12] Yadav, R. S., Tarafdar , J. C. : *Biol Fertil Soils* (2001)
- [13] Nagashima, T., Tange, T., Anazawa, H., *Appl. Enviroment Microbiol.* (1999)
- [14] Elkhailil EAI, El- Tinay AH., Mohamed BE., Elsheikh EAE., *Food Chem* 29-32 (2001)
- [15] Kaida, R., Serada, S., Norioka, N., Kaneko, T., : *Physiol. Plant* (2010)
- [16] Hurley, B., Tran, H.T., Marty, N.J., Park, J., Snedden, W.A., Mullen, R.T., Plaxton, W.C. : *Physiol. Plant* (2010)
- [17] Macintosh, C., Coggins, J., Cohen, P.,: *Biochem J.*, 733-738 (1991)
- [18] Ghelis, T., Bolbach, G., Clodic, G., Habricot, Y., Miginiac, E., Sotta, B., Jeannette, E. : *Physiol. Plant* (2008)
- [19] *Struktura para – nitrofenylfosfátu* – přístupné z URL:
http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=4686862&loc=ec_rcs
(16.9.2005)
- [20] Voet, D., Voet, J., : *Biochemistry* , Wiley International 704, (2004)

^[21] *Struktura fosfoserinu* – přístupné z URL:

<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=68841> (16.9.2004)

^[22] *Struktura fosfothreoninu* – přístupné z URL:

http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=3246323&loc=ec_res
(24.6.2005)